

# **Università degli Studi di Roma “La Sapienza”**

Dottorato di Ricerca in Epatogastroenterologia sperimentale e  
clinica-XXIX Ciclo

*Coordinatore Chiar.mo Prof. P. Onori*



Tesi di Dottorato:

***“Modificazioni del Microbiota nell’adulto vs. adolescente  
dopo Sleeve Gastrectomy laparoscopica”***

Tutor

Chiar.mo Prof. S. Ginanni Corradini

Dottoranda

Dott.ssa Francesca Abbatini

Anno Accademico 2017-2018

## INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni si è registrato un drammatico aumento in prevalenza dell'obesità, con un aumento globale del numero totale di individui in sovrappeso ed obesi da 857 milioni nel 1980 a 2.1 miliardi nel 2013. In particolare c'è stato un incremento del 47.1% nella prevalenza di obesità infantile dal 1980 al 2013 (1) Negli Stati Uniti si è registrato un drammatico incremento di obesità e obesità grave nel periodo compreso tra il 1988 e il 1994 e tra il 2013-2014. L'obesità infantile è aumentata dal 10,5% al 20,6%, e i casi di obesità grave dal 2.6% al 9.1% (2)

Nel 2014 in Italia circa 1 su 10 adulti era obeso, mentre il 40% era sovrappeso, in accordo con un report dell'Organizzazione per lo sviluppo economico e cooperazione. Mentre nei bambini, il 36% dei maschi e il 34% delle femmine erano in sovrappeso o obesi.(3)

L'obesità infantile tende a persistere anche in età adulta. Questo comporta il rischio di sviluppare comorbidità immediate, molte delle quali sono simili a quelle osservate in età adulta ( es. asma e problemi cognitivi durante l'infanzia, in età adulta: diabete, malattie cardiache, tumori, malattie respiratorie, disordini mentali e della sfera riproduttiva)(4)

L'obesità infantile è una sfida della sanità pubblica che richiede interventi di basso costo, attivi e mirati.(5-7) La chirurgia bariatrica viene raccomandata negli adolescenti per prevenire le conseguenze sulla salute a lungo termine.(8) Sebbene meno del 1% di tutte le procedure bariatriche venga eseguita attualmente negli adolescenti, si pensa che questa percentuale possa aumentare nel tempo.(9)

La sleeve gastrectomy e il gastric by-pass sono le procedure bariatriche più utilizzate, che esercitano cambiamenti differenti nella fisiologia del tratto gastrointestinale, probabilmente inducendo cambiamenti nel microbiota. Sfortunatamente questo ad oggi è stato studiato soprattutto su modelli animali e sono necessarie più evidenze per correlare i cambiamenti nella composizione del microbiota a marcatori indice di benessere. Dopo bypass gastrico è stata riportata una "normalizzazione" del microbiota intestinale associata ad un rimodellamento istologico e genetico del tessuto adiposo ed ad una riduzione dei fattori proinfiammatori (10).

Studi pionieristici su uomo e animali obesi hanno dimostrato molte delle più interessanti evidenze sulle interazioni benefiche e reciproche tra batteri e uomo (11). I batteri intestinali giocano chiaramente un ruolo importante nella regolazione del metabolismo energetico e della composizione corporea (12). Soprattutto la flora intestinale ha mostrato giocare un ruolo chiave nella degradazione

degli alimenti non digeribili, come i polisaccaridi e le fibre vegetali.(13) Il sequenziamento del genoma di vari organismi intestinali ha rivelato la presenza di capacità enzimatiche inerenti batteri intestinali, carenti nel genoma umano. Questo evidenzia che i batteri rendono digeribili alcuni componenti della dieta che sarebbero altrimenti inaccessibili all'ospite (14).

L'obiettivo primario di questo studio prospettico è stato quello di studiare la composizione del microbiota intestinale negli adolescenti e negli adulti obesi, ovvero negli adolescenti e adulti sani normopeso e quello di identificare batteri specifici che si correlano con l'obesità, focalizzandoci su possibili marcatori età-correlati.

Obiettivo secondario è stato quello di valutare, nell'adulto e nell'adolescente affetti da obesità patologica e candidati a chirurgia bariatrica, le modificazioni della composizione del microbiota intestinale dopo sleeve gastrectomy.

## **MATERIALI E METODI**

Sono stati arruolati dal 1° Ottobre 2014 in modo prospettico 25 pazienti adulti e 20 adolescenti obesi con indicazione alla chirurgia bariatrica o a trattamento multimodale (dieta ed esercizio fisico). I pazienti adulti sono stati arruolati secondo le linee guida della Società Italiana di Chirurgia dell'obesità (SICOB) presso il dipartimento di Medicina Clinica del Policlinico Umberto I, mentre gli adolescenti sono stati arruolati secondo le linee guida della Società Europea di gastroenterologia, epatologia e nutrizione pediatrica (ESPGHAN), presso l'Unità di Metagenomica del Microbioma umano dell'Ospedale Pediatrico Bambin Gesù (OPBG)(15). Al fine di ottenere uno studio caso-controllo età-correlato, sono stati arruolati, nello stesso periodo, 12 adolescenti e 12 adulti sani volontari normopeso (NP) presso l'Unità di Metagenomica del Microbioma umano dell'Ospedale Pediatrico Bambin Gesù (OPBG) e presso il dipartimento di Medicina Clinica del Policlinico Umberto I rispettivamente. La tabella 1 mostra i dati clinici e anamnestici dei pazienti obesi e dei controlli (CTRLs).(Tabella 1)

**Tabella 1.** Dati clinico-antropometrici dei pazienti e dei controlli sani (CTRL)

	Ob_ado	Ob_adulti	CTRL_ado	CTRL_adulti
<b>Pazienti N°</b>	25	20	12	12
<b>Sesso M/F</b>	14/11	14/6	8/4	8/4
<b>Età<sup>a</sup> ( media ± DS)</b>	16.16 ± 2.08	40.65 ± 11.65	16.92 ± 1.08	33.75 ± 10.59
<b>BMI<sup>b</sup> ( media ± DS)</b>	44.82 ± 6.09	41.02 ± 7.10	20.69 ± 0.88	21.02 ± 1.51
<b>Pregresso BIB(n°)</b>	9	-	-	-
<b>IGT/DMT2 (n°)</b>	6 IGT	4 IGT/1 DMT2	-	-
<b>Ipertensione arteriosa</b>	-	10	-	-

<sup>a</sup> Età in anni; <sup>b</sup> BMI in kg/m<sup>2</sup>

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione delle comorbidità, vediat psicologico e nutrizionale.

I criteri di inclusione utilizzati: razza Caucasica, età compresa tra i 13-19 anni per gli adolescenti obesi (ob\_ado) e i 20-65 anni per gli adulti obesi (ob\_adu); indice di massa corporea (BMI) compreso tra 30 e 60 kg/m<sup>2</sup> indicazione alla chirurgia bariatrica (Sleeve Gastrectomy).

I criteri di esclusione: positività istologica all'*Helicobacter pylori*, uso di corticosteroidi, antibiotici, o pre-probiotici nei due mesi precedenti; utilizzo di vitamina E o olio di pesce nei due mesi precedenti; patologie gastrointestinali croniche (es. IBD, IBS); precedenti interventi chirurgici con alterazione della fisiologia gastrointestinale e procedure bariatriche (escluso il posizionamento di Pallone intragastrico BIB ).

Lo studio è stato approvato dal Comitato etico dell'OPBG (protocollo n°768.12) per gli adolescenti e dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I (protocollo n°1003/13) per gli adulti.

A partire dall'arruolamento i pazienti sono stati invitati a compilare un questionario di quattro giorni sulle loro abitudini alimentari (diario alimentare).

L'ipertensione arteriosa è definita secondo i criteri modificati dell'NCEP ATP-III. I pazienti sono stati considerati affetti da ipertensione arteriosa se i valori superavano i 135/80 mm Hg.

Le alterazioni del metabolismo glucidico sono state definite in base ai criteri dell'American Diabetes Association (ADA).

I pazienti sono stati sottoposti a carico orale di glucosio (OGTT), con misurazioni della glicemia basali, a 30,60,90, 120 minuti dopo ingestione di 75 grammi di glucosio. I pazienti sono stati definiti come Normal Glucose Tolerant (NGT) se la glicemia era inferiore a 140 mg/dl a 120' minuti dall'OGTT, Impaired Glucose Tolerant (IGT) se la glicemia era compresa tra 140mg/dl e 200 mg/dl a 120' minuti dall'OGTT; affetti da Diabete mellito di tipo 2 (DMT2) se i valori di glicemia erano superiori a 200 mg/dl.

Alla visita successiva all'arruolamento , i pazienti hanno fornito il campione di feci (circa 2 grammi) e sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue a digiuno per dosaggio di: TSH, FT3, FT4, transaminasi, acidi biliari, glicemia, insulina, C-peptide, proteina C-reattiva, trigliceridi, colesterolo frazionato. Tutti hanno eseguito meal test con 250 ml di Oxepa ® assunto nell'arco di 10 minuti con l'esecuzione di ulteriori prelievi ematici a 90 e 120 per il dosaggio di transaminasi, acidi biliari totali, glicemia, insulina, proteina C-reattiva.

Dei 20 pazienti adulti obesi (ob\_adulti) arruolati, 10 sono stati sottoposti a sleeve gastrectomy .Tutti hanno eseguito a 6 mesi dall'intervento chirurgico: nuova campionatura di feci, pasto misto con 250 ml di Oxepa-® con relativi prelievi ematici, misurazione dati antropometrici.

Dieci pazienti obesi adulti(CTRL\_adulti) sono stati arruolati per trattamento multimodale (dietoterapia ed esercizio fisico) Di questi 5 hanno terminato il trattamento multimodale e hanno eseguito nuova campionatura feci, pasto misto e prelievi ematici, rilevazione parametri antropometrici. Due hanno optato per il trattamento chirurgico, 3 sono stati persi al follow-up.

Venticinque pazienti obesi adolescenti (ob-ado)sono stati arruolati e 21 sottoposti a sleeve gastrectomy. Tredici hanno raggiunto il follow-up di 6 mesi ed hanno eseguito campionatura di feci, pasto misto e prelievi ematici.

Quattro pazienti adolescenti obesi(CTRL\_ado) sono stati arruolati e candidati a terapia multimodale. Di questi :2 hanno interrotto il trattamento al 1° ciclo per scarsa compliance. Uno è uscito dal protocollo in quanto ha preferito l'intervento chirurgico. Uno ha terminato il trattamento ed è stato sottoposto a prelievi ematici, nuovo campionamento di feci.

I criteri di arruolamento dei volontari sani (CTRL) sono stati: BMI tra 18.5 e 24.9 kg/m<sup>2</sup> per gli adulti [15] e tra il 5° e l'85° percentile di BMI per età, per gli adolescenti [16], assenza di patologie croniche; assenza di infezioni gas-

trointestinali nei due mesi precedenti, dieta onnivora.

### ***Laparoscopic sleeve gastrectomy***

La sleeve gastrectomy laparoscopica, gastroresezione verticale, (LSG) è stata eseguita su una sonda calibratrice da 40 Fr, partendo da 6 cm dal piloro, utilizzando tutte cariche rivestite (synthetic glycolide-trimethylene carbonate copolymer Gore®Seamguard®Bioabsorbable Staple Line Reinforcement), ottenendo una capacità finale dello stomaco residuo di 90-100ml (misurato utilizzando intraoperativamente il test al blu di metilene).

### ***Estrazione del DNA genomico, pirosequenziamento e analisi quantitativa del microbica***

Il DNA genomico è stato isolato dall'intero set di 69 campioni, utilizzando il QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) Le regioni V1-V3 (520 bp) del locus 16 S RNA ribosomiale (rRNA) sono state amplificate per il successivo pirosequenziamento su di un Sequenziatore genomico 454- Junior (Roche 454 Life Sciences, Branford, USA), in accordo con le linee guida descritte da Ercolini et al. (16). I primers sono stati etichettati da 8 uniche sequenze nucleotidiche (Roche 454 Life Sciences, Branford, USA). Le reazioni a catena della polimerasi sono state effettuate utilizzando la Hi-Fi PCR Taq polimerasi (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), garantendo alta specificità, sensibilità, e accuratezza utilizzando l'amplificazione della PCR. Inoltre applicando 40 cicli di PCR, con 5 minuti di estensione, una bassa concentrazione di template (1 ng), abbiamo ridotto la percentuale di errori di PCR e di sequenze chimeriche. (17) Un primo risultato filtrato è stato eseguito utilizzando il segnale 454 Amplicon, da cui sono state analizzate usando il software QIIME 1.8.0 (18). Al fine di garantire un alto livello di accuratezza in termini di identificazione di Unità Tassonomiche Operazionali (OTUs), sono state eliminate dall'analisi sequenze con un punteggio medio di qualità inferiore a 25, più corte di 300 bp e con basi cosiddette ambigue. Le sequenze che avevano passato il filtro di qualità sono state processate (19) e i falsi positivi esclusi. Le sequenze processate sono state analizzate per le sequenze chimera utilizzando l'identificatore di sequenze chimera sia con approccio dei frammenti Blast sia chimera Slayer ([http://qiime.org/scripts/identify\\_chimeric\\_seqs.html](http://qiime.org/scripts/identify_chimeric_seqs.html))

Sono state utilizzate le OTUs con il 97% di similarità e le sequenze rappresentative sono state sottoposte a PyNAST per l'allineamento di sequenza (18), e a UCLUST per il clustering di sequenza.(20). Il database per l'accoppiamento delle OTUs è stato il Greengenes (v 13.8). Dopo rarefazione, le diversità  $\alpha$ - e  $\beta$ -

e il test ANOSIM sono stati effettuati tramite software QIIME, utilizzando `alpha_rarefaction.py`, `beta_diversity_attraverso_plots.py`, `confrontando_categories.py` scripts; è stato utilizzato lo script per la significatività di gruppo per effettuare il Kruskal Wallis test (21)

### *Analisi statistica*

Le OTUs presenti in una percentuale al di sotto del 25% dei campioni sono state rimosse prima di effettuare l'analisi statistica. Al termine del processo di filtrazione, le OTUs prese in considerazione per l'analisi statistica sono state ridotte a 47/222 .

I tests statistici (Shapiro-Wilk test, ANOVA, Least Significant Difference [LSD] test, Mann-Whitney U test, Receiver Operating Characteristic [ROC], Discriminant Analysis [DA], Principal Component Analysis [PCA], Lambda Wilks test, Spearman's correlations) sono stati eseguiti dal software dell'IBM SPSS versione 21.

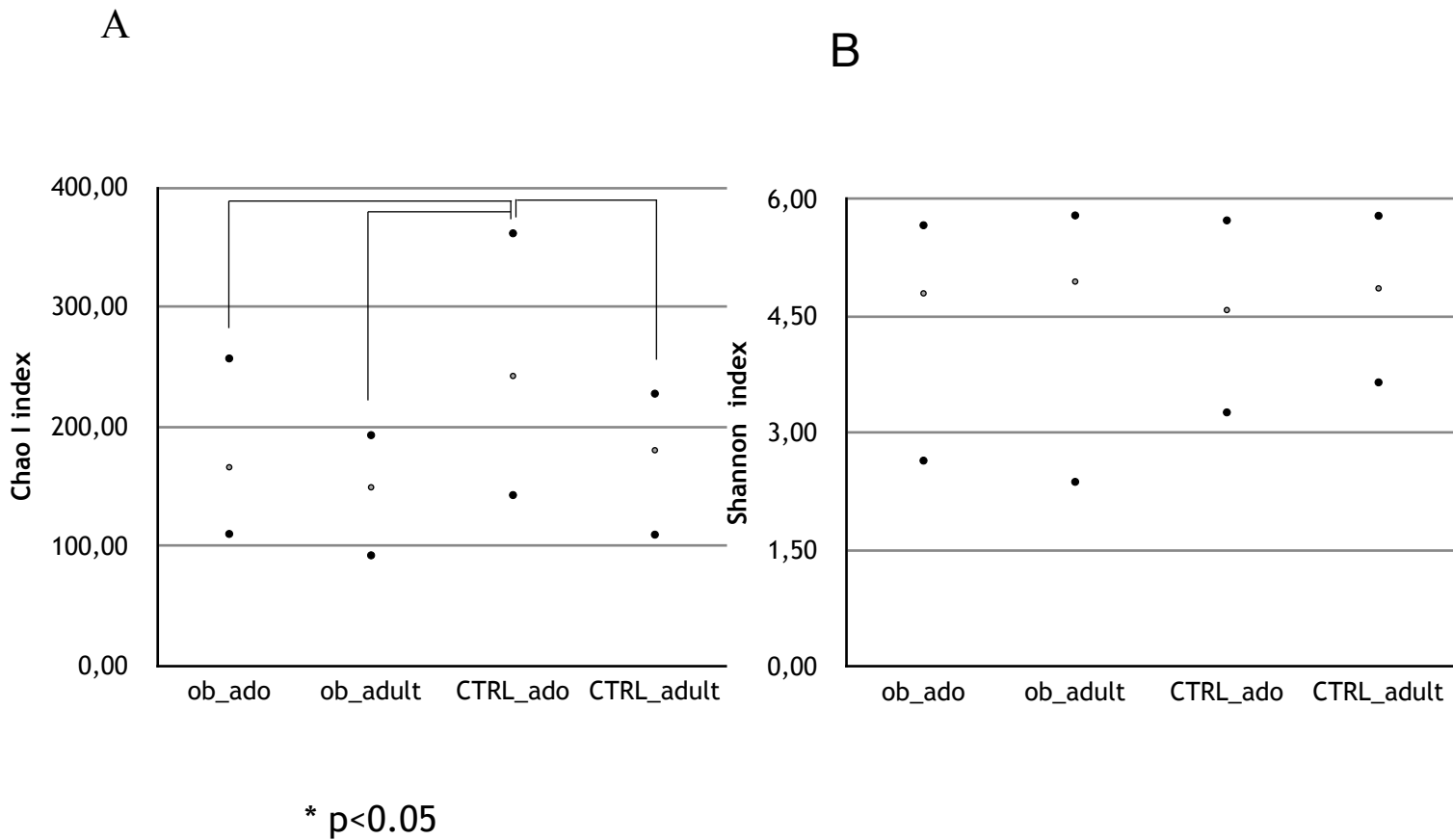
Per predire i contenuti funzionali metagenomici dal 16S rRNA gene surveys , Picrust v1.1.0 tool sono stati applicati (22), e per ottenere i KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) abbiamo analizzato la funzione predetta dal programma HUMAnN2 v0.99. (23). Inoltre al fine di trovare i biomarkers KEGG associati agli obesi adolescenti e ai controlli, abbiamo effettuato l'analisi Linear discriminant effect size (LeFse) ( $\alpha$  value = 0.05, logarithmic LDA score threshold = 2.0) ( 24).

## **RISULTATI**

### *Diversità ecologiche del microbiota nei pazienti obesi adulti e nei controlli sani.*

Sono state ottenute un totale di 139,783.00 sequenze lette da 69 campioni di feci, con un valore medio di 2,025.84 sequenze per campione. Abbiamo identificato un totale di 222 OTUs, raggruppati in 14 phylum e 79 famiglie.

Per valutare tutte le differenze di strutture della comunità microbica nei pazienti e nei controlli CTRLs, abbiamo misurato i parametri ecologici basati sulle diversità alpha (Indici ChaoI e Shannon).(Figura1.)



**Figura 1.**

Il test di Fisher delle significatività (LSD) eseguito sui valori di ChaoI e gli indici di Shannon ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi solo per l'indice di ChaoI (Figura 1, grafico A e grafico B).

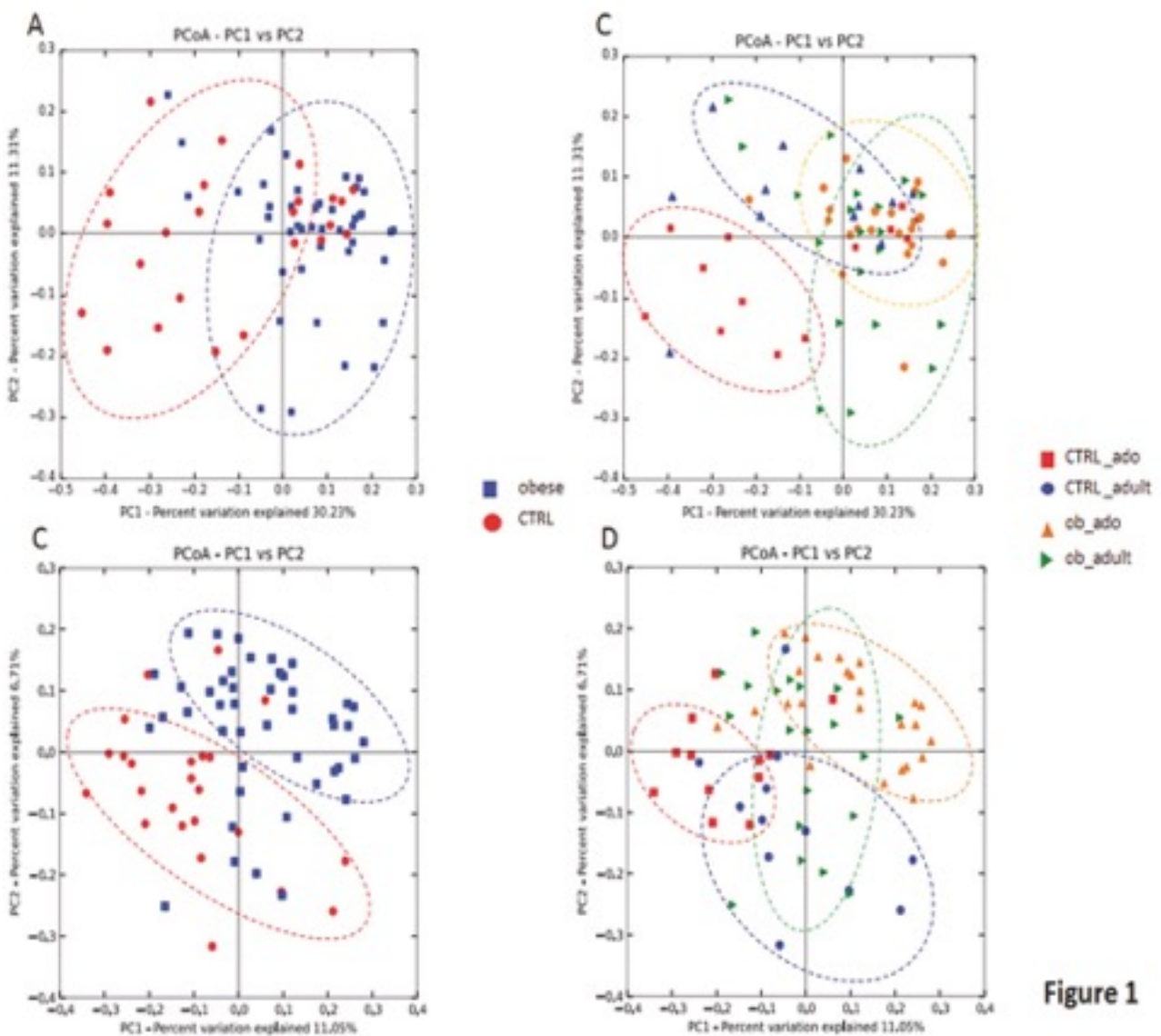
Il più alto valore di indice di ChaoI lo abbiamo ottenuto nel gruppo CTRL\_ado (242.28), seguito dal gruppo CTRL\_adulti (180.23), ob\_ado (166.03), e ob\_adulti (149.28) (Fig S1 grafico A). I valori medi dell'indice di Shannon sono simili nei 4 gruppi (Figura S1, grafico B)

Al fine di determinare le differenze strutturali nelle comunità microbiche nei pazienti obesi e nei CTRLs, abbiamo calcolato le diversità  $\beta$  utilizzando misurazioni pesate e non pesate Unifrac e validando queste analisi con il test statistico ANOSIM. Le analisi delle Unifrac pesate hanno svelato le diversità delle comunità che nascono dalle differenze nelle abbondanze relative delle OTUs, mentre le analisi delle Unifrac non pesate considerano solo la presenza/assenza

delle OTUs.

I nostri risultati hanno dimostrato che, attraverso le analisi Unifrac pesate, la prima coordinata (PC1) mostra il 30,23% della varianza tra i campioni ( $p=0.01$ ; Figura 1 grafico A), mentre l'analisi Unifrac non pesata mostra l'11.5% negli obesi rispetto al gruppo di CTRL ( $p=0.01$ ); Figura 1 grafico C) Stratificando i campioni per età, abbiamo trovato che i due gruppi di adolescenti (ob\_ado e CTRL\_ado) formavano definiti e separati cluster rispetto agli adulti. ( $p=0.01$ ; Figura 2, grafico B e D)

**Figura 2.**

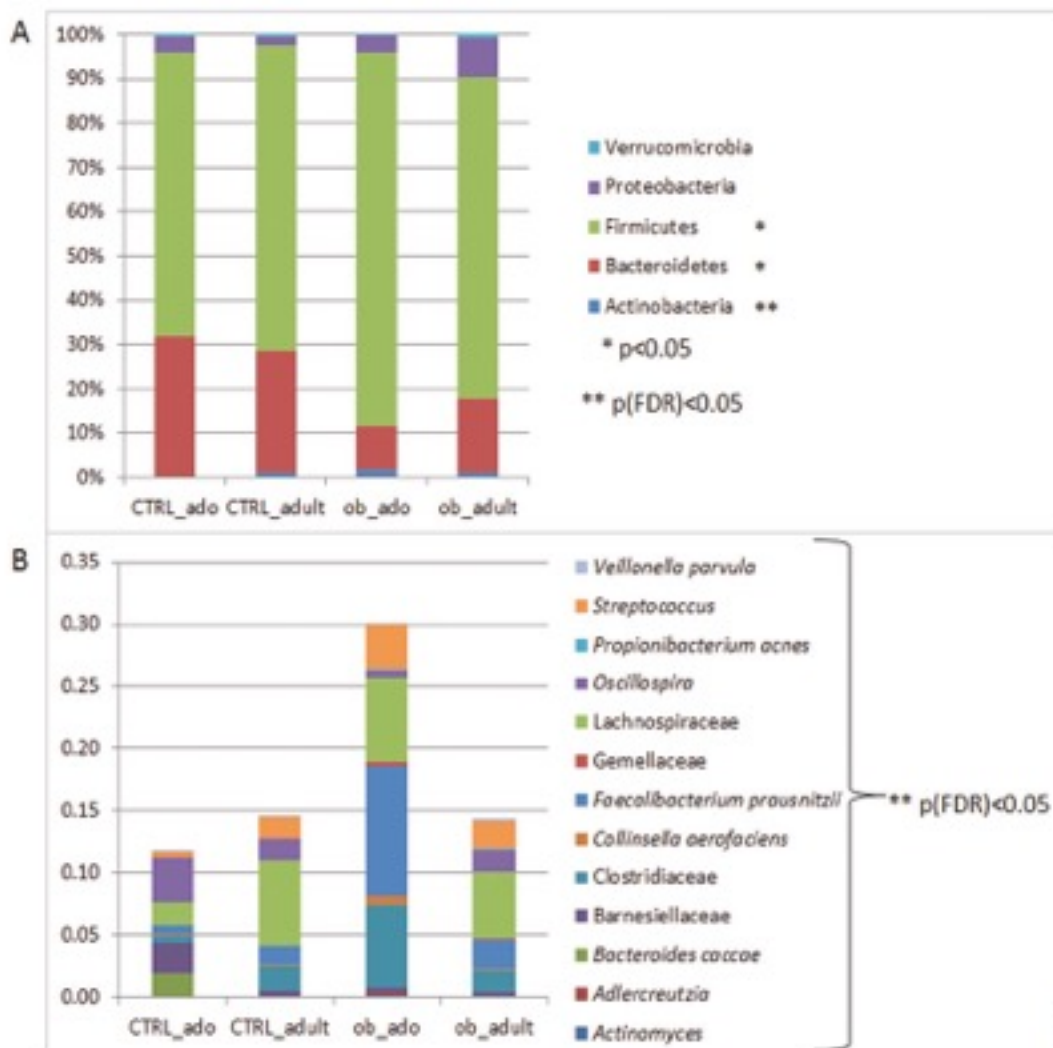


**Figure 1**

Raggruppando le OTUs a livello di phylum, abbiamo preso in considerazione le abbondanze relative dei cinque phylum maggiori (es. *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*).

Applicando il test di Kruskal-Wallis per le abbondanze relative di phylum per i 4 Gruppi/Gruppo CTRL, abbiamo osservato differenze statisticamente significative nella distribuzione di *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* ( $p < 0.05$ ) Sebbene, la correzione di una percentuale di falsi positivi (FDR) di valori p abbia definito *Actinobacteria* l'unica unità tassonomica significativamente differente nei 4 gruppi. (Figura 3 , grafico A, Tabella 2)

**Figura 3.**



**Figure 2**

**Tabella 2.** Test di Kruskal-Wallis sulle OTUs a livello di phylum per i gruppi CTRL\_ado, CTRL\_adulti, ob\_ado, ob\_adulti. Nelle colonne sono riportati i vari medi di p e FDR di ciascun phylum per tutti i gruppi.

OTU	ob_ado	ob_adulti	CTRL_ado	CTRL_adulti	P	FDR_P
Actinobacteria	0.0176	0.0111	0.0025	0.0096	<b>0.0006</b>	<b>0.0052</b>
Bacteroidetes	0.0963	0.1657	0.3138	0.2702	<b>0.0423</b>	0.1352
Firmicutes	0.8400	0.7234	0.6367	0.6792	<b>0.0172</b>	0.0690
Proteobacteria	0.0391	0.0879	0.0329	0.0195	0.1765	0.4034
Verrucomicrobia	0.0020	0.0075	0.0062	0.0044	0.5475	0.6653

Abbiamo applicato il test U di Mann-Whitney per ricercare quale phylum risultava statisticamente significativo nel confronto parallelo tra obesi/CTRL. Nel confronto di distribuzione *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* erano statisticamente significativi per le coppie ob\_ado/ob\_adulti, con livelli di *Actinobacteria* più elevati per il gruppo ob\_ado, mentre i livelli di *Bacteroidetes* erano predomi-

nanti nel gruppo ob\_adulti *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* erano statisticamente significativi per le coppie ob\_ado vs CTRL\_ado e ob\_ado vs CTRL\_adult.(Tab 3)

**Tabella 3.** Test U di Mann Whitney sulle OTUs a livello di phylum per i gruppi CTRL\_ado, CTRL:adulti, ob\_ado, ob\_adulti

		Actinobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Proteobacteria	Verrucomicrobia
ob_ado versus ob_adult	Mann-Whitney U	127	180	142	235	195.5
	Wilcoxon W	337	505	352	560	520.5
	Z	-2.81	-1.6	-2.47	-0.34	-1.32
	p value	<b>0.00</b>	0.11	<b>0.01</b>	0.73	0.19
ob_ado versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	34	84	82	107	123
	Wilcoxon W	112	409	160	185	448
	Z	-3.77	-2.14	-2.21	-1.4	-0.94
	p value	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	0.16	0.35
ob_ado versus CTRL_adult	Mann-Whitney U	102	82	78	99	146.5
	Wilcoxon W	180	407	156	177	471.5
	Z	-1.56	-2.21	-2.34	-1.66	-0.12
	p value	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	0.1	0.9
ob_adult versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	71	84	90	81	112
	Wilcoxon W	149	294	168	159	190
	Z	-1.92	-1.4	-1.17	-1.52	-0.33
	p value	0.06	0.16	0.24	0.13	0.74
ob_adult versus CTRL_adult	Mann-Whitney U	97.5	93	109	78.5	100.5
	Wilcoxon W	307.5	303	187	156.5	178.5
	Z	-0.88	-1.05	-0.43	-1.62	-0.81
	p value	0.38	0.29	0.67	0.11	0.42

CTRL_ado versus CTRL_adult	Mann-Whitney U	43	67	64	69	63
	Wilcoxon W	121	145	142	147	141
	Z	-1.7	-0.29	-0.46	-0.17	-0.57
	p value	0.09	0.77	0.64	0.86	0.57

Il test di Kruskal-Wallis per livelli di OTU ha rivelato le seguenti differenze statisticamente significative: *Actinomyces*, *Adlercreutzia*, *Bacteroides caccae*, *Barnesiellaceae*, *Clostridiaceae*, *Collinsella aerofaciens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Gemellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospira*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* e *Veillonella parvula* (positive [p]FDR < 0.05; Figura 4 Grafico B, Tabella 4.)

**Tabella 4.**

		Actinobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Proteobacteria	Verrucomicrobia
ob_ado versus ob_adult	Mann-Whitney U	127	180	142	235	195.5
	Wilcoxon W	337	505	352	560	520.5
	Z	-2.81	-1.6	-2.47	-0.34	-1.32
	p value	<b>0.00</b>	0.11	<b>0.01</b>	0.73	0.19
ob_ado versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	34	84	82	107	123
	Wilcoxon W	112	409	160	185	448
	Z	-3.77	-2.14	-2.21	-1.4	-0.94
	p value	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	0.16	0.35
ob_ado versus CTRL_adult	Mann-Whitney U	102	82	78	99	146.5
	Wilcoxon W	180	407	156	177	471.5
	Z	-1.56	-2.21	-2.34	-1.66	-0.12
	p value	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	0.1	0.9

ob_adult versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	71	84	90	81	112
	Wilcoxon W	149	294	168	159	190
	Z	-1.92	-1.4	-1.17	-1.52	-0.33
	p value	0.06	0.16	0.24	0.13	0.74
ob_adult versus CTRL_adult	Mann-Whitney U	97.5	93	109	78.5	100.5
	Wilcoxon W	307.5	303	187	156.5	178.5
	Z	-0.88	-1.05	-0.43	-1.62	-0.81
	p value	0.38	0.29	0.67	0.11	0.42
CTRL_ado versus CTRL_adult	Mann-Whitney U	43	67	64	69	63
	Wilcoxon W	121	145	142	147	141
	Z	-1.7	-0.29	-0.46	-0.17	-0.57
	p value	0.09	0.77	0.64	0.86	0.57

In particolare, il gruppo CTRL\_ado era caratterizzato da un'alta quantità di *B. caccae*, *Barnesiellaceae*, *Lachnospiraceae* e *Oscillospira*, mentre il gruppo CTRL\_adulti da un alta quantità di *Streptococcus*, *Clostridiaceae*, *F. prausnitzii*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospira*.

Anche per il gruppo ob\_ado sono stati riportati alti livelli di *Clostridiaceae*, *F. prausnitzii*, *Lachnospiraceae* e *Streptococcus*, mentre per il gruppo ob\_adulti erano presenti soprattutto: *Clostridiaceae*, *F. prausnitzii*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospira* e *Streptococcus* (Figura 4, Grafico B, Tabella 4).



Sulla base di questi risultati, è stato applicato il test di U Mann-Whitney per 13 OTUs selezionate ( $p$  (FDR) $<0.05$  dal test di Kruskal-Wallis) per identificare differenze statisticamente significative tra coppie in parallelo. (Tabella 5.)

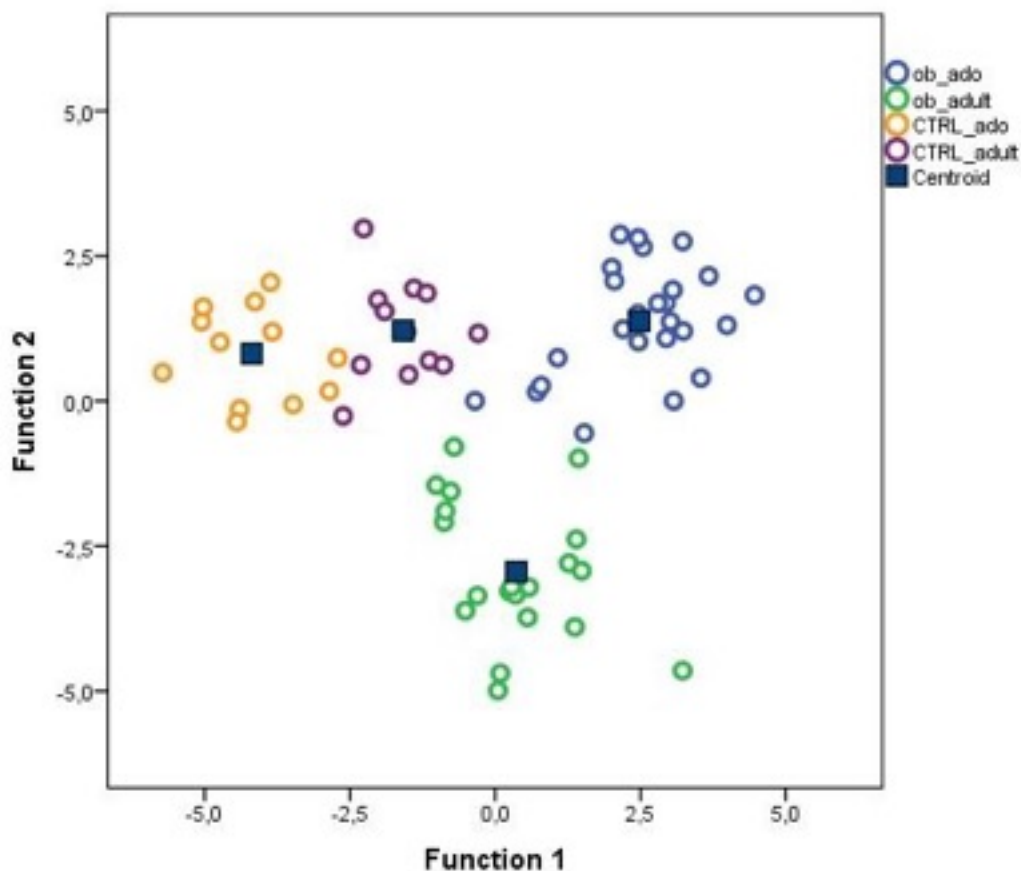
**Tabella 5. Test di Kruskal-Wallis sulle OTUs a livello di famiglia/specie per i gruppi CTRL\_ado, CTRL\_adulti, ob\_ado, ob\_adulti. Nelle colonne sono riportati i valori medi di  $p$  e FDR\_p per ciascun confronto statisticamente significativo.**

	ob_ado	ob_adult	CTRL_ado	CTRL_adult	P values	FDR
<i>Actinomyces</i>	0.0014	0.0002	0.0005	0.0000	<b>0.0002</b>	<b>0.0099</b>
<i>Adlercreutzia</i>	0.0024	0.0000	0.0000	0.0004	<b>0.0020</b>	<b>0.0449</b>
<i>Bacteroides caccae</i>	0.0007	0.0001	0.0185	0.0003	<b>0.0007</b>	<b>0.0228</b>
<i>Barnesiellaceae</i>	0.0034	0.0035	0.0248	0.0049	<b>0.0009</b>	<b>0.0249</b>
<i>Clostridiaceae</i>	0.0665	0.0178	0.0063	0.0191	<b>0.0005</b>	<b>0.0189</b>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	0.0067	0.0012	0.0011	0.0012	<b>0.0000</b>	<b>0.0010</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.1051	0.0237	0.0068	0.0156	<b>0.0011</b>	<b>0.0283</b>
Gemellaceae	0.0027	0.0001	0.0002	0.0000	<b>0.0035</b>	<b>0.0463</b>
Lachnospiraceae	0.0676	0.0539	0.0183	0.0693	<b>0.0001</b>	<b>0.0099</b>
<i>Oscillospira</i>	0.0065	0.0182	0.0363	0.0166	<b>0.0025</b>	<b>0.0463</b>
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.0013	0.0008	0.0002	0.0002	<b>0.0029</b>	<b>0.0463</b>
<i>Streptococcus</i>	0.0356	0.0220	0.0040	0.0174	<b>0.0031</b>	<b>0.0463</b>
<i>Veillonella parvula</i>	0.0012	0.0027	0.0000	0.0004	<b>0.0025</b>	<b>0.0463</b>

Al fine di definire un modello basato sulla capacità delle OTUs di discriminare i quattro gruppi di studio abbiamo effettuato l'analisi discriminante (DA) basata sull'univariata ANOVA, il coefficiente di classificazione Fisher's e la classificazione "leave-one-out"-

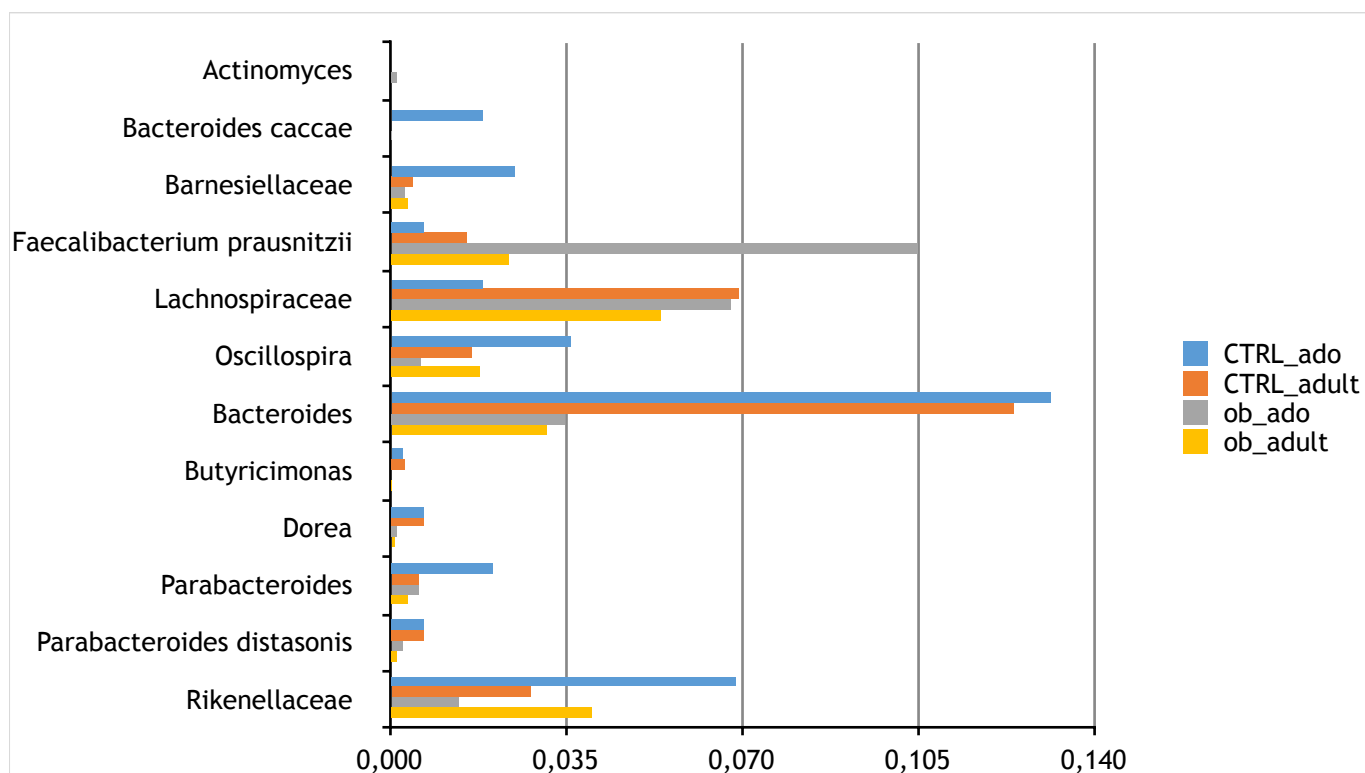
Il DA ha mostrato che il 98,6% dei gruppi originali erano ben classificati ed è stata rilevata una chiara separazione tra gli obesi e i gruppi di CTRL (Figura 3) In particolare, la figura mostra una netta separazione tra i campioni dei 4 gruppi, con la maggior parte dei campioni che si trovano vicino al baricentro del

gruppo di appartenenza, sebbene una piccola separazione è stata osservata nei gruppi di obesi (ob\_ado e ob\_adulti) (Figura 5)



**Figura 5.**

Sebbene, applicando il test di validazione incrociato (cross-validation test CV), basato sulla classificazione leave-one -out, abbiamo trovato che soltanto il 34.8% dei casi di validazione incrociati raggruppati era correttamente classificato, questo spiegato dal fatto che l'intero set di OTUs ha una bassa capacità di distinguere i 4 gruppi. Per questo motivo, utilizzando una  $p < 0.05$  come filtro (dal test Lambda di Wilks) abbiamo selezionato solo 12 OTUs (Tabella 6.; Figura 6.) testando la loro capacità discriminatoria nella corretta classificazione dei gruppi partecipanti allo studio utilizzando la media dell'area sotto la curva del Receiver Operating Characteristic (ROC)



**Figura 6.**

		Actinomyces	Adlercreutzia	Bacteroides caccae	Barnesiellaceae	Clostridiaceae	Collinella aerofaciens	Faecalibacterium prausnitzii	Gemellaceae	Lachnospiraceae	Oscillospira	Propionibacterium acnes	Streptococcus	Veillonella parvula
ob_ado versus ob_adult	Mann-Whitney U	156.00	157.50	234.00	201.00	172.00	73.00	173.00	203.00	184.00	139.00	216.00	219.00	167.00
	Wilcoxon W	366.00	367.50	444.00	526.00	382.00	283.00	383.00	413.00	394.00	464.00	426.00	429.00	377.00
	Z	-2.15	-2.11	-0.37	-1.12	-1.78	-4.04	-1.76	-1.07	-1.51	-2.54	-0.78	-0.71	-1.90
	p value	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	0.71	0.26	0.07	<b>0.00</b>	<b>0.05</b>	0.28	0.13	0.11	0.44	0.48	0.06
ob_ado versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	75.00	77.00	74.00	41.00	40.00	85.50	42.00	109.00	23.00	51.00	60.00	39.00	83.00
	Wilcoxon W	153.00	155.00	399.00	366.00	118.00	163.50	120.00	187.00	101.00	376.00	138.00	117.00	161.00
	Z	-2.43	-2.37	-2.47	-3.54	-3.57	-2.09	-3.50	-1.33	-4.12	-3.21	-2.92	-3.60	-2.17

	p value	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	0.18	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>
ob_ado versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	61.00	106.00	145.00	144.00	67.00	48.00	60.00	101.00	148.00	85.00	66.00	139.00	103.00
	Wilcoxon W	139.00	184.00	223.00	469.00	145.00	126.00	138.00	179.00	226.00	410.00	144.00	217.00	181.00
	Z	-2.89	-1.43	-0.16	-0.19	-2.69	-3.31	-2.92	-1.59	-0.06	-2.11	-2.73	-0.36	-1.52
	p value	<b>0.00</b>	0.15	0.87	0.85	<b>0.01</b>	0.00	0.00	0.11	0.95	0.03	0.01	0.72	0.13
ob_ado It versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	73.00	85.00	47.00	40.00	56.00	87.00	60.00	92.00	44.00	86.00	61.00	40.00	102.00
	Wilcoxon W	151.00	163.00	257.00	250.00	134.00	297.00	138.00	170.00	122.00	296.00	139.00	118.00	180.00
	Z	-1.83	-1.36	-2.84	-3.11	-2.49	-1.28	-2.34	-1.09	-2.96	-1.32	-2.30	-3.11	-0.70
	p value	0.07	0.17	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	0.20	<b>0.02</b>	0.28	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	0.48
ob_ado It versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	82.00	113.00	119.00	97.00	77.00	119.00	69.00	96.00	97.00	114.00	67.00	115.00	119.00
	Wilcoxon W	160.00	323.00	197.00	175.00	155.00	197.00	147.00	174.00	307.00	324.00	145.00	325.00	329.00
	Z	-1.48	-0.27	-0.04	-0.90	-1.67	-0.04	-1.99	-0.93	-0.90	-0.23	-2.06	-0.19	-0.04
	p value	0.14	0.79	0.97	0.37	0.09	0.97	<b>0.05</b>	0.35	0.37	0.82	<b>0.04</b>	0.85	0.97
CTRL_ado versus CTRL_ado	Mann-Whitney U	64.00	55.00	29.00	23.00	58.00	52.00	64.00	68.00	22.00	51.00	71.00	32.00	65.00
	Wilcoxon W	142.00	133.00	107.00	101.00	136.00	130.00	142.00	146.00	100.00	129.00	149.00	110.00	143.00
	Z	-0.46	-0.98	-2.48	-2.83	-0.81	-1.15	-0.46	-0.23	-2.89	-1.21	-0.06	-2.31	-0.40
	p value	0.64	0.33	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	0.42	0.25	0.64	0.82	<b>0.00</b>	<b>0.02</b>	0.95	<b>0.02</b>	0.69

**Tabella 6.**Analisi discriminante (DA) basata su 12 OTUs selezionate e 4 gruppi.

L'Area sotto la curva RO( /AUROC) per il gruppo ob\_ado era 0.75 per *F.prausnitzii*, 0.735 per *Actinomyces*; nel gruppo CTRL\_ado era 0.706 per *Parabacteroides*, 0.731 per *Rikenellaceae*, 0.781 per *B.caccae*, 0.848 per *Barnesiellaceae* e 0.725 per *Oscillospira* (Tabella 7.)

**Tabella 7. Test Lambda di Wilks su 47 Otus a livello di famiglia/specie**

		Groups	predicted group membership				Total
			ob_ado	ob_adult	CTRL_ado	CTRL_adult	
Original	Count	ob_ado	24	1	0	0	25
		ob_adult	0	20	0	0	20
		CTRL_ado	0	0	12	0	12
		CTRL_adult	0	0	0	12	12
	%	ob_ado	96	4	0	0	100
		ob_adult	0	100	0	0	100
		CTRL_ado	0	0	100	0	100
		CTRL_adult	0	0	0	100	100
Cross-validated	Count	ob_ado	9	8	5	3	25
		ob_adult	3	9	4	4	20
		CTRL_ado	4	1	2	5	12
		CTRL_adult	1	4	3	4	12
	%	ob_ado	36	32	20	12	100
		ob_adult	15	45	20	20	100
		CTRL_ado	33.3	8.3	16.7	41.7	100
		CTRL_adult	8.3	33.3	25	33.3	100

I valori di AUROC 0.7, basati sulla classificazione proposta da Swets (Swets, 1988), sono stati considerati non accurati nel discriminare i gruppi di studio. Per i gruppi ob\_adulti e CTRL\_adulti i valori di AUROC erano <0.7. Questi risultati indicano che le variabili *F.prausnitzii* e *Actinomyces* erano accurate nel distinguere il gruppo ob\_ado, mentre *Parabacteroides*, *Rikenellaceae*, *B.caccae*, *Barnesiellaceae* *Oscillospira*, ci hanno consentito di distinguere il gruppo CTRL\_ado. (Figura 7.)

Figura 7.

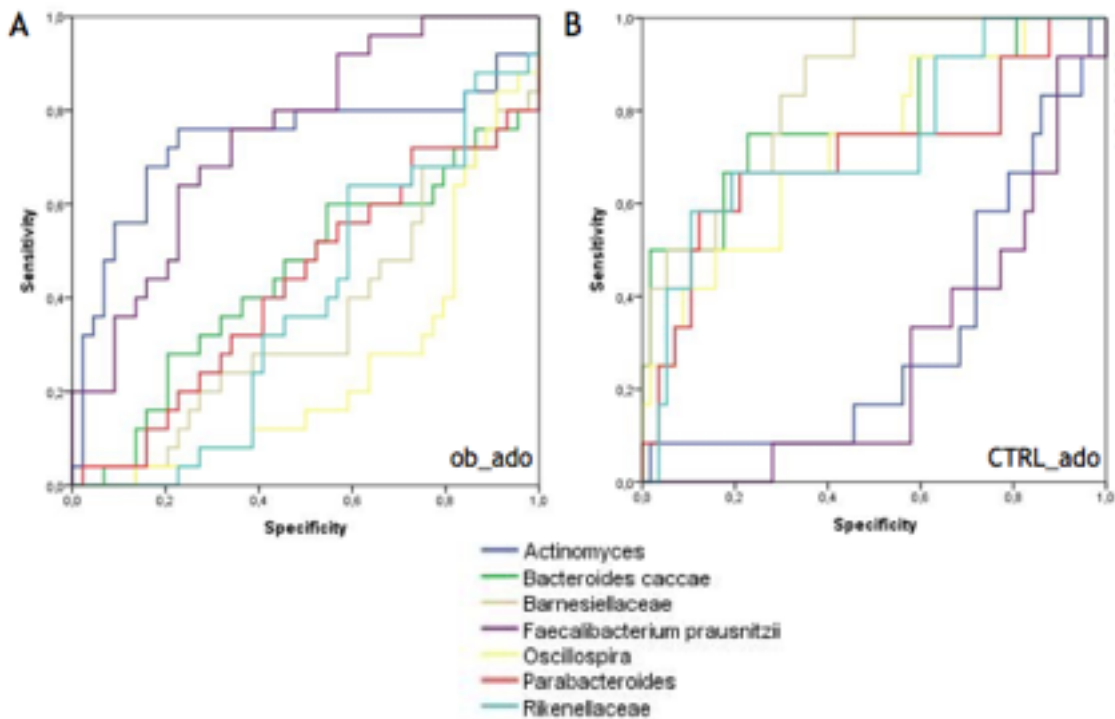


Figure 4

Anche se nessuna OTUs è stata in grado di discriminare i gruppi degli adulti. Al fine di verificare la capacità di queste sette OTUs selezionate di discriminare ob\_ado e CTRL\_ado, è stata eseguita una DA, basata sulla univariata ANOVA, coefficiente di Fisher e la classificazione leave one-out. Come mostrato nella Tabella 8, i risultati del DA hanno mostrato che l'89.2% dei gruppi originali erano classificati correttamente come ob\_ado e CTRL\_ado.

**Tabella 8. Area sotto la curva ROC (AUROC) delle OTUs risultate statisticamente significative dal test Lambda di Wilks**

Variables	ob_ado	ob_adu	CTRL_ado	CTRL_adu
	<b>AUROC</b>			
<i>Actinomyces</i>	<b>0.735</b>	0.491	0.310	0.326
<i>Bacteroides caccae</i>	0.450	0.410	<b>0.781</b>	0.428
Barnesiellaceae	0.351	0.492	<b>0.848</b>	0.404
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<b>0.750</b>	0.535	0.266	0.282
Lachnospiraceae	0.677	0.487	0.130	0.604
<i>Oscillospira</i>	0.250	0.572	<b>0.725</b>	0.573
<i>Bacteroides</i>	0.414	0.382	0.674	0.635
<i>Butyricimonas</i>	0.363	0.490	0.689	0.547
<i>Dorea</i>	0.521	0.405	0.468	0.635
<i>Parabacteroides</i>	0.432	0.464	<b>0.706</b>	0.455
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.463	0.397	0.655	0.553
Rikenellaceae	0.387	0.537	<b>0.731</b>	0.398

Applicando il test CV, basato sulla classificazione leave-one-out, abbiamo trovato che solo l'83.8% dei casi raggruppati incrociati erano stati correttamente classificati, confermando i risultati del ROC.

### ***Correlazioni tra le caratteristiche cliniche e antropometriche e le abbondanze di batteri***

Al fine di valutare le caratteristiche tra batteri e caratteristiche cliniche e antropometriche (es. età, sesso, body mass index [BMI]), abbiamo selezionato i valori cut-off rho di Spearman, tenendo anche in considerazione  $r > 0.4$ ,  $r < -0.4$



**Tabella 9.** Analisi discriminante (DA) basata su 7 OTUs selezionate e i due gruppi di adolescenti

groups			predicted group membership		Total
			ob_ado	CTRL_ado	
<b>Original</b>	Count	ob_ado	25	0	25
		CTRL_ado	4	8	12
	%	ob_ado	100.0	0.0	100.0
		CTRL_ado	33.3	66.7	100.0
<b>Cross-validated</b>	Count	ob_ado	25	0	25
		CTRL_ado	6	6	12
	%	ob_ado	100.0	0.0	100.0
		CTRL_ado	50.0	50.0	100.0

Per il gruppo ob-adulti, *Coprococcus* era positivamente correlato con il BMI, mentre *Bacteroides fragilis*, *Dehalobacterium*, *Lachnospira* e *Enterobacteriaceae*, erano negativamente correlati con il BMI. *Blautia* e *Lachnospiraceae* erano negativamente correlati con il BMI. *Blautia* e *Lachnospiraceae* era negativamente correlato con il sesso. Tuttavia il diabete era positivamente correlato con la presenza di *Bacteroidaceae*, *P.distasonis*, *Lachnospiraceae* e *Blautia*, ma negativamente correlato con *Prevotella*, *Lachnospira* ed *Enterobacteriaceae*.

L'ipertensione era correlata a *Sutterella*, *Butyricimonas* e *Paraprevotella*. Nessuna OTU era correlata all'età (Figura 8., Tabella 9.) L'analisi nel gruppo CTRL\_ado evidenzia una correlazione positiva tra età e BMI, e una corre-



Hy per ten sio n	0.10.30.30.3	0.20.20.20.10.70.20.30.30.2	$\frac{0}{3}$ 0.40.7	$\frac{0}{6}$ 0.3	$\frac{0}{3}$ 0.40.30.20.20.40.30.20.40.40.90.20.40.10.40.40.20.30.80.70.80.80.30.20.90.50.20.50.20.50.20.70.3
------------------------------	--------------	-----------------------------	----------------------	-------------------	--

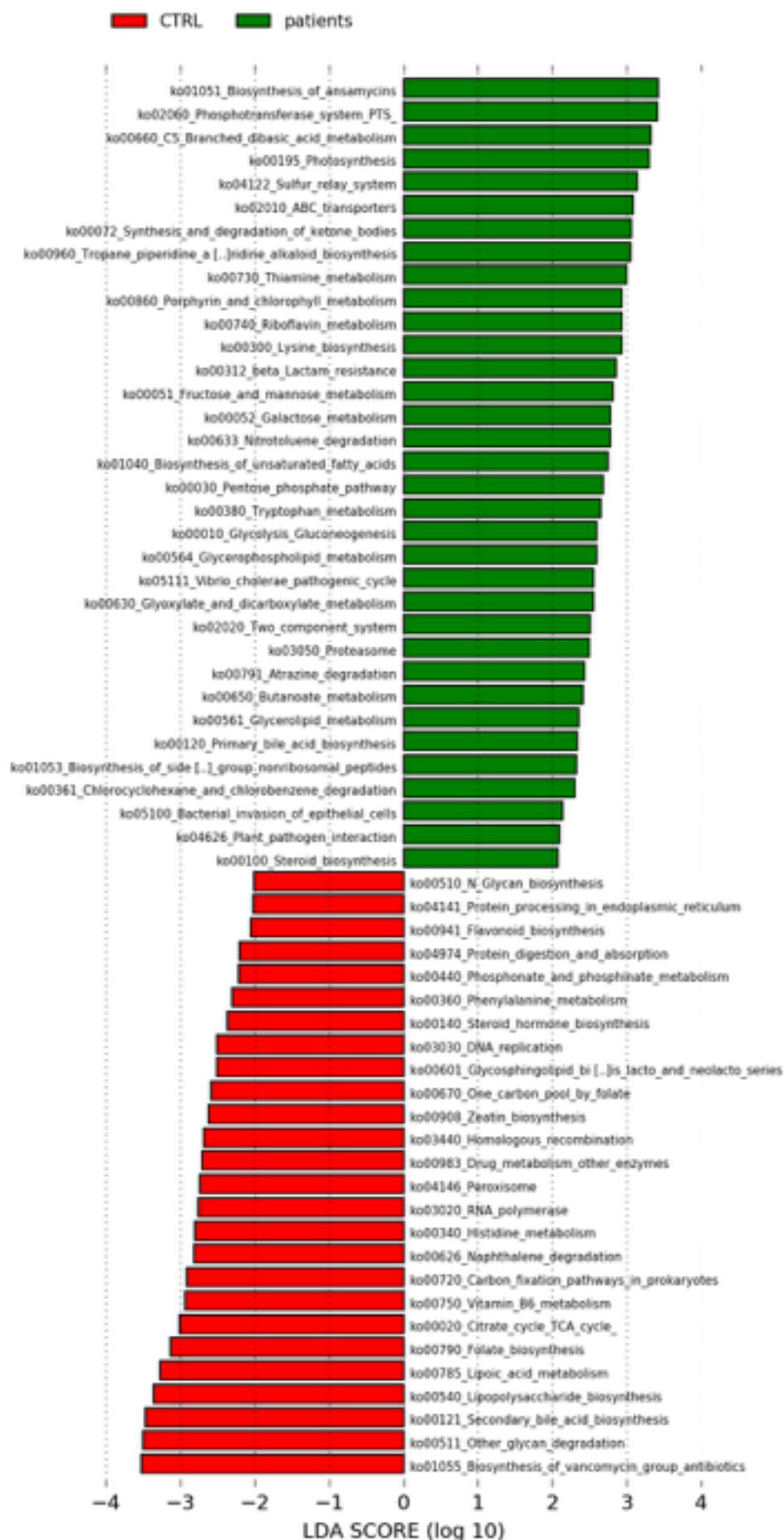
Nel gruppo CTRL\_adulti, non abbiamo trovato correlazioni tra OTUs ed età, mentre *A. muciniphila* era negativamente correlato con BMI. Inoltre, il sesso era negativamente correlato con *Blautia* e positivamente con *Clostridium* e *Sutterella* (Figura 8., Tabella 10.)

Variazioni nei meccanismi d'azione del microbiota intestinale negli obesi adolescenti e CTRLs.

Un totale di 60 percorsi KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) sono stati generati utilizzando la composizione del microbiota intestinale basata su PICRUSSt negli obesi adolescenti e nei CTRLs. Trentaquattro percorsi KEGG erano significativamente aumentati nel gruppo ob\_ado, mentre 26 erano significativamente aumentati nel gruppo CTRL\_ado.

Tra questi: la biosintesi degli acidi biliari primari, quella degli steroidi, il metabolismo del fruttosio e mannosio, la glicolisi/gluconeogenesi, il metabolismo del galattosio, il metabolismo del butanoato e del penoso fosfato erano per lo più associati all'obesità; mentre il metabolismo e la biosintesi della glicina, la biosintesi degli acidi biliari secondari, la biosintesi degli ormoni steroidi e il metabolismo dell'acido lipoico erano associati agli adolescenti normopeso. (Figura 9., Tabella 11.)

Figura 9.





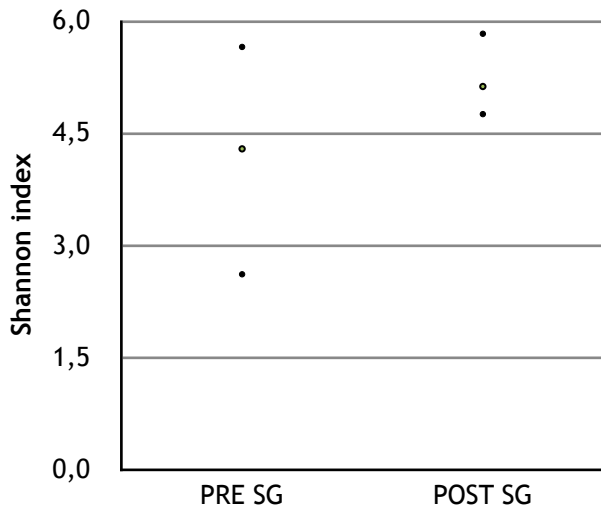
***Diversità ecologiche del microbiota nei pazienti obesi adolescenti (ob\_ado) pre e post-sleeve gastrectomy.***

Venticinque pazienti obesi adolescenti (ob-ado) sono stati arruolati e 21 sottoposti a sleeve gastrectomy. Tredici hanno raggiunto il follow-up di 6 mesi ed hanno eseguito campionatura di feci, pasto misto e prelievi ematici. (Tabella 12.)

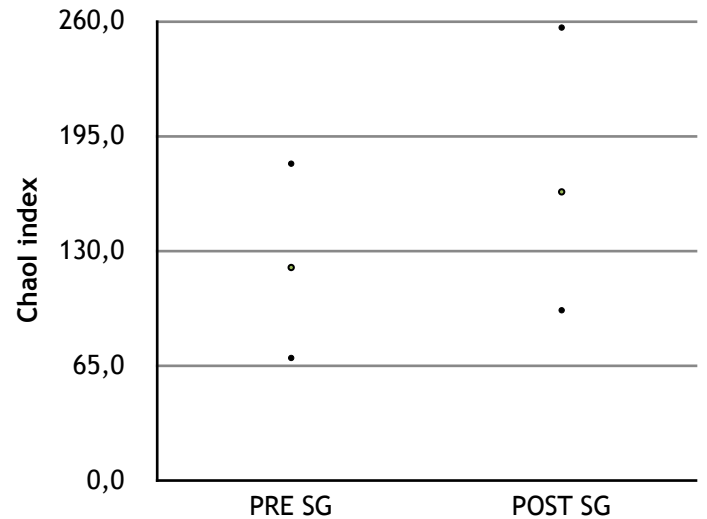
**Tabella 12.** Caratteristiche preoperatorie dei pazienti obesi adolescenti (ob\_ado) sottoposti a sleeve gastrectomy

N°=13	
Età (anni)	15,9 (13-19)
M/F	9/4
Peso (Kg)	127,7 (85-180)
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	44,9 (36,3-56,1)
Diabete/IGT (n°)	0/6
Dislipidemia (n°)	0
Ipertensione (n°)	0
OSAS (n°)	1
Steatosi epatica (n°)	lieve: 9

Per valutare tutte le differenze di strutture della comunità microbica nei pazienti ob\_ado pre e post sleeve abbiamo misurato i parametri ecologici basati sulle diversità alpha (Indici ChaoI e Shannon). (Figura 10. grafico A e B)



A



B

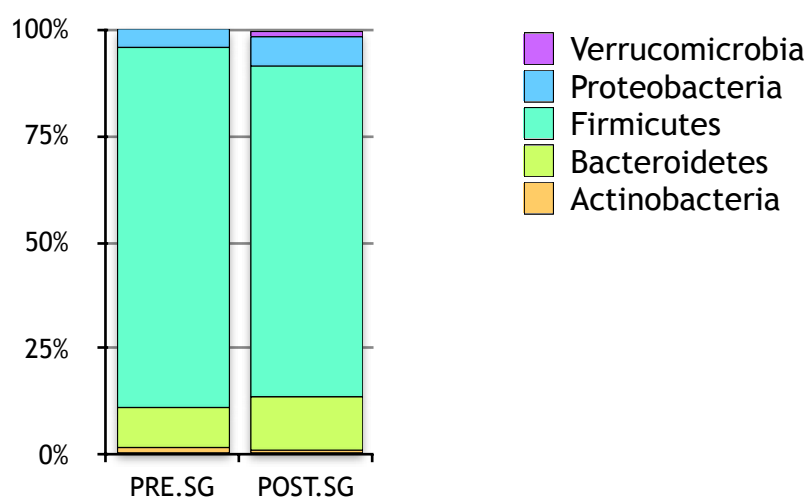
**Figura 10. Grafico A e grafico B**

Il test di Fisher delle significatività (LSD) eseguito sui valori di ChaoI e gli indici di Shannon ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi sia per l'indice di ChaoI (Figura 10, grafico B) sia per l'indice di Shannon. Il più alto valore di indice di ChaoI ottenuto post sleeve gastrectomy è 260,0, (Figura 10, grafico B).

Raggruppando le OTUs a livello di phylum, abbiamo preso in considerazione le abbondanze relative dei cinque phylum maggiori (es. *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*).

Applicando il test di Kruskal-Wallis per le abbondanze relative di phylum per i pazienti ob\_ado pre e post sleeve gastrectomy abbiamo osservato differenze statisticamente significative nella distribuzione di *Actinobacteria* ( $p < 0.05$ ) (Figura 11, Tabella 13.)

Figura 11.Tabella 13.



	PRE.SG	POST.SG	P	FDR_P
<b>Actinobacteria</b>	<b>0.01838</b>	<b>0.01209</b>	<b>0.02602</b>	<b>0.33822</b>
Bacteroidetes	0.09322	0.12434	0.96060	0.96060
Firmicutes	0.84256	0.77250	0.21681	0.92446
Proteobacteria	0.03953	0.06484	0.28445	0.92446
Verrucomicrobia	0.00124	0.01912	0.62528	0.96060

Applicando il test di Kruskal-Wallis per le abbondanze relative di genere/specie pre e post sleeve gastrectomy abbiamo osservato differenze statisticamente significative nella distribuzione di *Clostridi*

*ales, Erysipelotrichaceae, Abiotrophia, Haemophilus parainfluenzae, Propionibacterium acnes,* ( $p < 0.05$ ) E' in corso l'analisi delle correlazioni tra le caratteristiche cliniche e antropometriche e le abbondanze di batteri.

***Diversità ecologiche del microbiota nei pazienti obesi adulti (ob\_adulti) pre e post-sleeve gastrectomy.***

Dieci dei 20 pazienti adulti arruolati sono stati sottoposti a sleeve gastrectomy laparoscopica presso l'unità di Chirurgia Generale e Centro di Eccellenza di Chirurgia Bariatrica, Università La Sapienza polo Pontino Icot. Tutti hanno raggiunto 6 mesi di follow-up e sono stati sottoposti a nuovo campionamento di feci, pasto misto con esami ematici, valutazione antropometrica. (Tabella 14.)

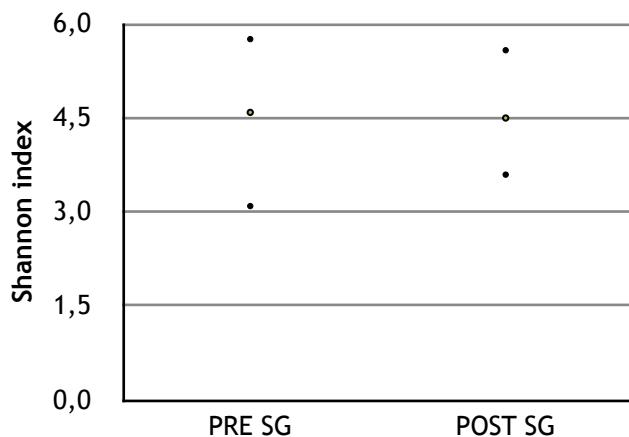
**Tabella 14. Caratteristiche pre-operatorie dei pazienti adulti obesi (ob\_adulti)**

<i>N°=10</i>	
<i>Età (anni)</i>	<i>34,8 (21-60)</i>
<i>M/F</i>	<i>1/10</i>
<i>Peso (Kg)</i>	<i>124 (97,2-150,8)</i>
<i>BMI (Kg/m2)</i>	<i>45,6 (40,5-50,4)</i>
<i>Diabete/IGT (n°)</i>	<i>1*/3</i>
<i>Dislipidemia (n°)</i>	<i>4</i>
<i>Ipertensione (n°)</i>	<i>4</i>
<i>OSAS (n°)</i>	<i>0</i>
<i>Steatosi epatica (n°)</i>	<i>lieve: 8 lieve/moderata:1</i>

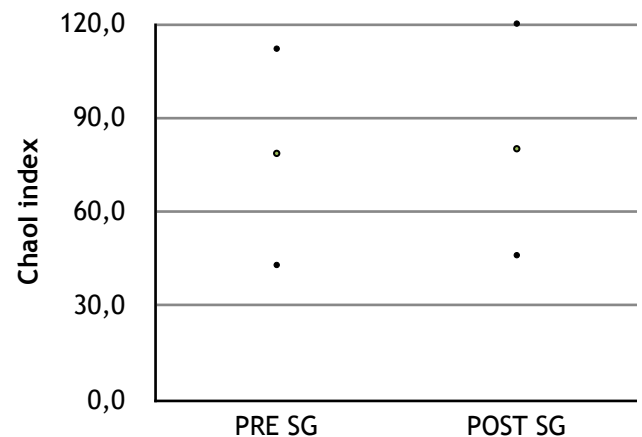
Al fine di valutare tutte le differenze di strutture della comunità microbica nei pazienti ob\_ado pre e post sleeve abbiamo misurato i parametri eco-

logici basati sulle diversità alpha (Indici ChaoI e Shannon).(Figura 12. grafico A e B)

**Figura 12.** Grafico A e grafico B



A



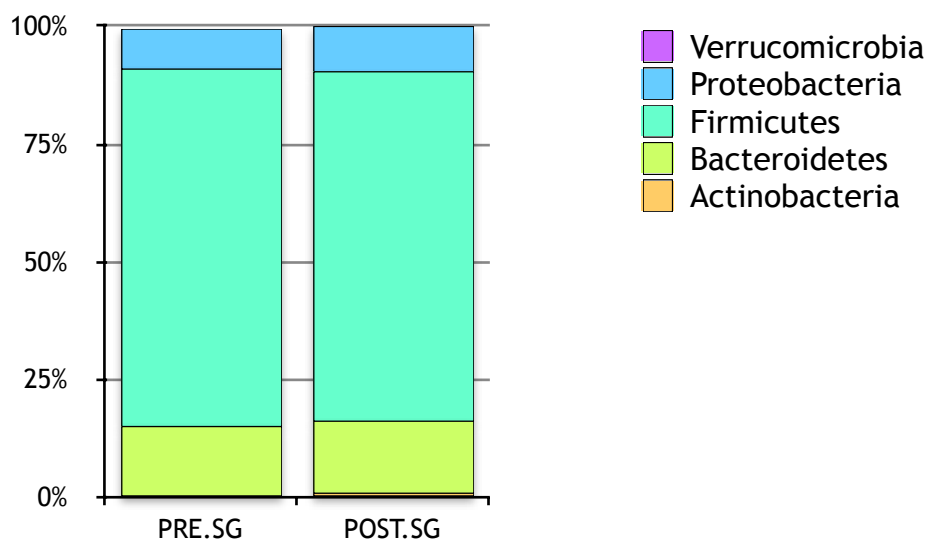
B

Il test di Fisher delle significatività (LSD) eseguito sui valori di ChaoI e gli indici di Shannon non ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi sia per l'indice di ChaoI (Figura 12.,grafico B) sia per l'indice di Shannon. Il più alto valore di indice di ChaoI ottenuto post sleeve gastrectomy è 120,0, (Figura 12. grafico B). I valori dell'indice di Shannon non differiscono significativamente pre e post-sleeve gastrectomy.(Figura 12.Grafico A)

Raggruppando le OTUs a livello di phylum, abbiamo preso in considerazione le abbondanze relative dei cinque phylum maggiori (es. *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*).

Applicando il test di Kruskal-Wallis per le abbondanze relative di phylum per i pazienti ob\_adulti pre e post sleeve gastrectomy non abbiamo osservato dif-

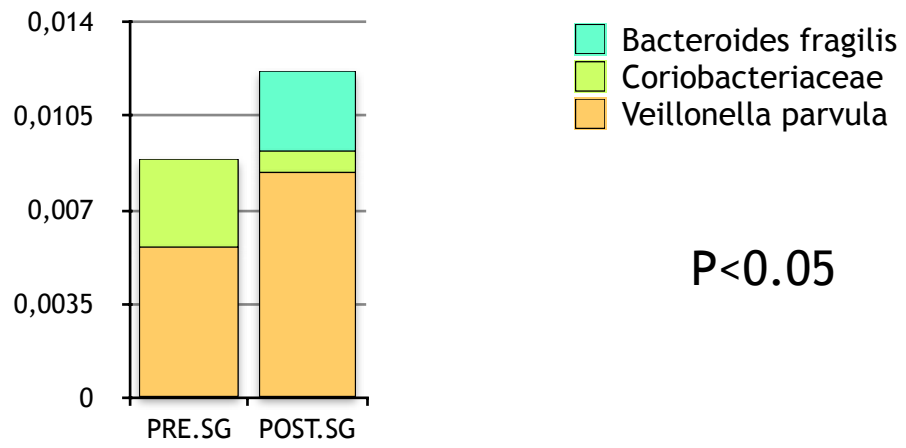
ferenze statisticamente significative nella distribuzione di *phyla* ( $p < 0,05$ ). *Figura 13. Tabella 15.*



	PRE.SG	POST.SG	P	FDR_P
Actinobacteria	0.00459	0.00917	0.77678	1.00000
Bacteroidetes	0.14485	0.14924	0.77820	1.00000
Firmicutes	0.75647	0.74115	0.83269	1.00000
Proteobacteria	0.08280	0.09456	1.00000	1.00000
Verrucomicrobia	0.00540	0.00210	0.29484	1.00000

**Figura 13. Tabella 15.**

Applicando il test di Kruskal-Wallis per le abbondanze relative di genere/specie pre e post sleeve gastrectomy abbiamo osservato differenze statisticamente significative nella distribuzione di *Bacteroides fragilis*, *Coriobacteriaceae*, *Veillonella parvula*. ( $p < 0.05$ ) (Figura 14.)



**Figura 14.**

E' in corso l'analisi delle correlazioni tra le caratteristiche cliniche e antropometriche e le abbondanze di batteri.

## DISCUSSIONE

Il microbiota intestinale può essere considerato un organo metabolico per la sua influenza nella regolazione dell'assorbimento energetico, per il suo coinvolgimento nel metabolismo dell'ospite e per il rilascio di ormoni intestinali.(25)

Numerosi studi hanno dimostrato che le comunità microbiche negli individui obesi sono meno abbondanti rispetto agli individui magri.(26,27,28)

In particolare, Le Chatelier e collaboratori hanno dimostrato che individui con una minor abbondanza di batteri presentavano una marcata adiposità viscerale, insulino-resistenza e dislipidemia, confrontati con soggetti magri che mostravano una elevata abbondanza di batteri (27)

In questo studio, l'analisi dell'abbondanza di batteri, in particolare delle OTUs, ha evidenziato una correlazione diretta tra elevata abbondanza nei soggetti normo-peso, mostrando invece un declino dell'indice ChaoI all'aumentare dell'età ed in presenza di obesità. Oltretutto, l'analisi delle diversità  $\beta$  ha evidenziato differenze nella composizione delle OTUs e le loro relative abbondanze tra campioni di soggetti obesi e quelli dei controlli sani, come precedentemente riportato da Lin e collaboratori. (29).

Tuttavia, studi precedenti riguardavano separatamente obesi adulti e adolescenti, per cui questa caratterizzazione del profilo del microbiota nell'obesità correlato all'età non poteva essere fatta. Questi lavori inoltre riportavano risultati contrastanti sulla composizione del microbiota, portando a delle conclusioni confondenti riguardo i ruoli dei microrganismi, sia in termini di batteri patogeni che protettivi.

Il nostro lavoro si è focalizzato pertanto non solo sulle differenze di composizione del microbiota intestinale nei pazienti obesi confrontati con i controlli sani, ma anche sulle differenze tra adolescenti e adulti obesi e non, al fine di verificare una associazione età-correlata tra microbiota e obesità.

Il modello basato sulle OTUs, ci ha consentito di assegnare come markers *F. prausnitzii* e *Actinomyces* al gruppo Obesi adolescenti( Ob\_ado), mentre *Parabacteroides*, *Rikenellaceae*, *B. caccae*, *Barnesiellaceae*, e *Oscillospira* al gruppo di controllo (CTRL\_ado).

*F. prausnitzii* appartiene ad una delle specie più comuni del tratto gastrointestinale nell'adulto nutrito con una dieta di tipo Occidentale (30) ; la sua presenza è stata associata ad un basso successo di diete dimagranti. (27).

*F. prausnitzii* è in grado di convertire le fibre della dieta in butirrato utilizzando soprattutto il butirril CoA attraverso la via acetato CoA- transferasi(BUT).. Alti

livelli di butirrato sono considerati responsabili dell'obesità indotta dalla dieta(29).

Alcune specie di *F. prausnitzii* sembrerebbero avere un ruolo nello sviluppo del diabete di tipo 2 per le loro differenze nella produzione di butirrato e questo potrebbe essere un punto di partenza per la prevenzione e la terapia delle comorbidity legate all'obesità. Anche se Song e coll., hanno dimostrato che non tutte le sotto-specie di *F. prausnitzii* producono le stesse quantità di butirrato, per cui è mandatorio caratterizzare tutte le specie al fine di descrivere meglio le loro funzioni nel microbioma.

Inoltre, *F. prausnitzii* ha un ruolo chiave nel metabolismo dell'ospite, in quanto consente la fermentazione di carboidrati non assorbiti. La presenza di *F. prausnitzii* nell'intestino di obesi adolescenti è stata riportata da Balamurugan e coll, probabilmente per un aumento di energia provocata da carboidrati non assorbiti, che potrebbe altrimenti contribuire al basso dispendio calorico di energia.(31).

Le specie di *Actinomyces* fanno parte della flora microbica residente in zone distinte della bocca. Contribuiscono a differenti tipi di malattie legate alla placca dentale (32) e si correlano con una dieta ricca di glucosio. (33). Inoltre , in due case reports , *Actinomyces* sono stati scoperti responsabili di una actinomicosi gastrica come complicanza dopo bypass gastrico per obesità patologica. (34, 35). Nel nostro studio *Actinomyces* è stato ritrovato correlato al microbiota intestinale in adolescenti obesi.

Tra le OTUs che si correlano con il microbiota intestinale dei soggetti normopeso adolescenti abbiamo trovato *Parabacteroides*, and *B. caccae* entrambi appartenenti al phylum *Bacteroidetes*. *P. distasonis* è stato ritrovato soprattutto nell'intestino di individui sani (36). In aggiunta, studi su modelli umani e murini hanno dimostrato una correlazione positiva tra *Bacteroidetes* e perdita di peso.(37, 11).

Riguardo l'associazione di *Barnesiellaceae* al gruppo dei normopeso, Chiu e coll , utilizzando una meta-analisi sull'associazione tra microbiota intestinale e obesità hanno riportato alti livelli di *Barnesiella* (appartenenti alla famiglia delle *Barnesiellaceae*) nei controlli rispetto ai soggetti obesi. (38)

Le modificazioni nella capacità funzionale del microbiota intestinale indicato dai percorsi KEGG risultano differenti tra i soggetti adolescenti obesi e i normopeso. Il microbiota dei soggetti normopeso adolescenti è significativamente ricco di vie del metabolismo e biosintesi di glicano.

L' influenza del glicano nell'intestino rappresenta uno dei maggiori fattori che

influenzano la composizione e la fisiologia del microbiota. La maggior parte dei glicani origina da una dieta ricca di fibre e dalla secrezione della mucosa dell'ospite. La fermentazione microbica trasforma questi glicani non digeriti in acidi grassi a catena corta (SCFA), che sono i nutrienti delle cellule dell'epitelio del colon e di altre cellule epiteliali dell'intestino (38). La biosintesi della maggior parte degli acidi biliari primari è associata agli adolescenti obesi, mentre la biosintesi degli acidi biliari secondari era associata ai soggetti normopeso. Gli acidi biliari primari (es. colico e chenodesossicolico), sono steroidi prodotti dal fegato dal colesterolo e secreti nel piccolo intestino, dopo la loro coniugazione con taurina o glicina. Molte specie di batteri gram-positivi come i Lattobacilli dissociano gli acidi biliari primari (39). Dopo la dissociazione, ulteriori modificazioni ad opera dei batteri danno origine agli acidi biliari secondari (40), che è compiuta solo da una popolazione minore di specie di *Clostridium* anaerobi gram-positivi (41). È interessante notare che gli acidi biliari, in particolare i secondari, influenzano la spesa energetica e l'omeostasi glucidica attraverso i loro effetti sulla gluconeogenesi, la secrezione di insulina e la sensibilità insulinica. (42). Inoltre la biosintesi degli ormoni steroidei e la via del metabolismo dell'acido lipoico sono associate ai soggetti normopeso. La regolazione di alcune proteine chiave nel tessuto adiposo attraverso gli ormoni sessuali steroidei potrebbe essere un ulteriore meccanismo per il trattamento/prevenzione dell'obesità.(43). La regolazione della lipoprotein lipasi (LPL) potrebbe essere un modo per prevenire o trattare l'obesità viscerale (44). Gli estrogeni potrebbero causare una diminuzione di produzione di insulin-like growth factor 1 (IGF-1), che potrebbe favorire una diminuzione dell'attività dell'LPL e l'obesità viscerale (45). Inoltre Saengsirisuwan e colleghi hanno dimostrato che la somministrazione cronica di acido lipoico aumenta la tolleranza al glucosio e il trasporto nel muscolo del glucosio nei ratti obesi (46) È interessante notare che il microbioma degli adolescenti è significativamente ricco di percorsi KEGG coinvolti nel metabolismo del fruttosio, mannosio, nella glicolisi/gluconeogenesi, nel metabolismo del galattosio, in quello del butanato, e del pentoso fosfato. Anche nel modello di dieta che induce obesità, la dieta occidentale ricca di grassi e zuccheri, è associata al sistema fosfotransferasi, al metabolismo del fruttosio e del mannosio, alle vie della glicolisi/gluconeogenesi, dovuto alla presenza in abbondanza di *Firmicutes* con una riduzione di *Bacteroidetes* (47).

Inoltre nei ratti in cui era stato trapiantato il microbiota da gemelli obesi, è stata scoperta la più grande espressione di geni microbici coinvolti nella via del fosfato (48). Ulteriormente, il microbiota dei ratti obesi codificava per molti enzimi coinvolti nella digestione dei polisaccaridi non digeribili, incluse le vie KEGG per il metabolismo del galattosio e del butanoato.(47).

Queste scoperte suggeriscono che il microbiota intestinale di soggetti obesi potrebbe influenzare i metaboliti che caratterizzano lo stato di obesità. Quindi

il microbiota fecale sembrerebbe funzionare come unità ecologica, la cui composizione e diversità locali sono in larga parte determinati da processi guidati da nicchie ecologiche (49). Fattori esterni, come dieta e stile di vita, ma anche malattie, come l'obesità, il diabete o sindromi metaboliche, alterano l'ambiente delle nicchie attraverso la fornitura di nuovi nutrienti, portando a cambiamenti nella struttura del microbiota.

Per quanto riguarda i risultati preliminari delle differenze di composizione microbica pre e post sleeve gastrectomy (6 mesi) nei gruppi di pazienti adolescenti obesi (Ob\_ado), abbiamo riportato differenze statisticamente significative nella distribuzione di: *Clostridiales*, *Erysipelotrichaceae*, *Abiotrophia*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Propionibacterium acnes*, ( $p < 0.05$ ) dopo l'intervento chirurgico.

Nel gruppo ob\_adulti abbiamo osservato differenze statisticamente significative nella distribuzione di *Bacteroides fragilis*, *Coriobacteriaceae*, *Veillonella parvula*. ( $p < 0.05$ ). E' in corso l'analisi delle correlazioni tra le caratteristiche cliniche e antropometriche e le abbondanze di batteri.

Dalla letteratura abbiamo appreso che la chirurgia bariatrica induce importanti cambiamenti nella composizione del microbiota umano (50, 29, 10). La maggior parte dei cambiamenti riguarda l'aumento di Proteobatteri (E.coli, Enterobacter spp), la diminuzione di Clostridium e cambiamenti riguardanti Bacteroides e Prevotella .

In uno studio recente Medina et al, hanno confrontato le modificazioni del microbiota intestinale in pazienti sottoposti a Gastric by-pass, sleeve gastrectomy e terapia dietetica ed hanno riportato un aumento della famiglia Bacteroides dopo RYGB (Roux and Y Gastric by-pass) , mentre dopo sleeve gastrectomy questa era meno rappresentata. (51) Nel nostro studio non abbiamo riportato cambiamenti statisticamente significativi di distribuzione di Proteobacteria dopo sleeve gastrectomy, come riportato in altri studi dopo RYGBP (50-55).

E' necessario il completamento dell'analisi di correlazione tra le caratteristiche cliniche e antropometriche. Inoltre la mancanza del gruppo di controllo (pazienti a dieta), dovuto a scarsa compliance dei pazienti adulti e adolescenti a trattamenti dietoterapici, non ci consente di poter trarre conclusioni al momento riguardo i cambiamenti della composizione del microbiota pre e post-intervento rispetto al gruppo di controllo.

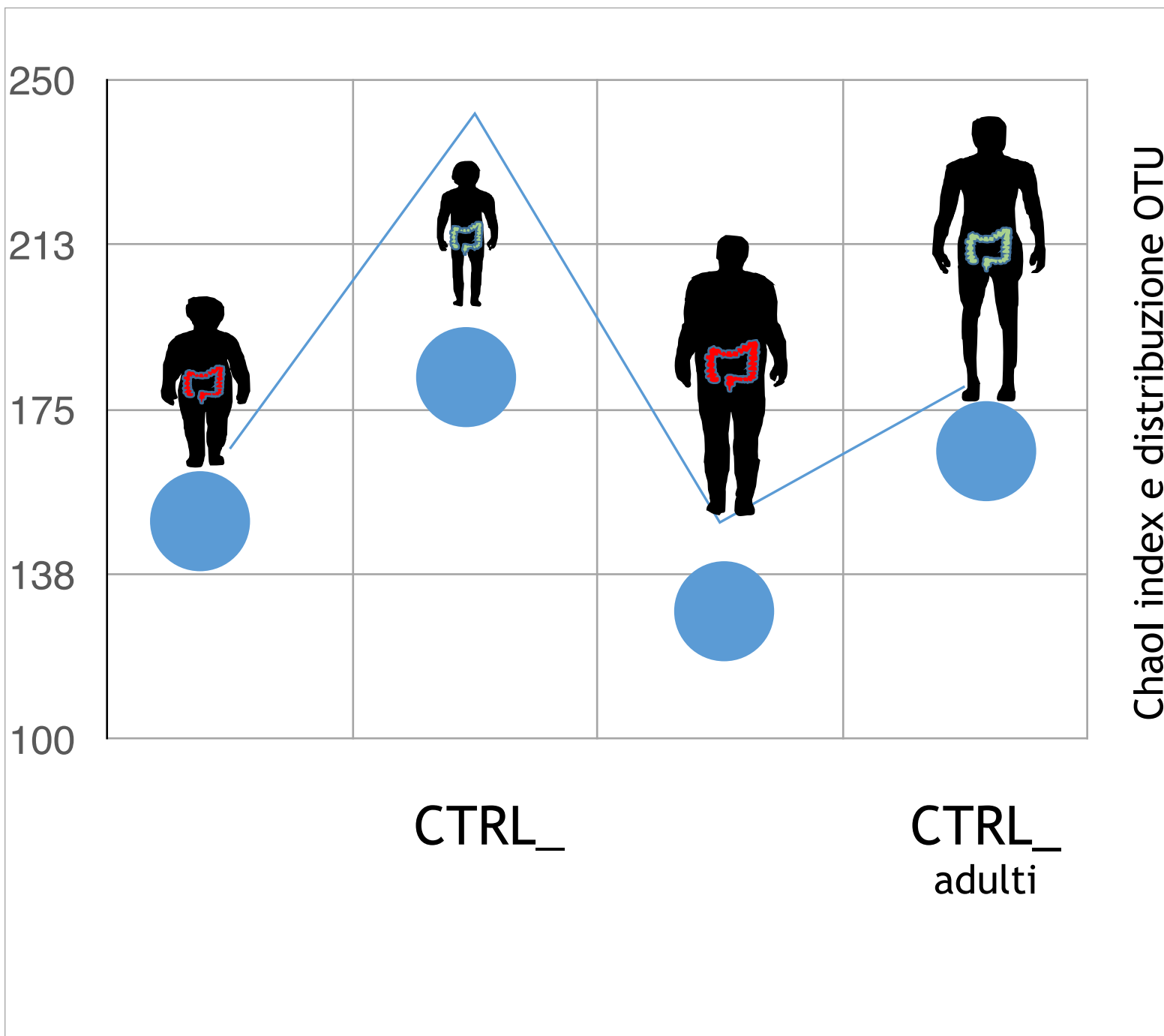
In conclusione questo studio ha dimostrato caratteristiche uniche nella diversità ecologica, nella composizione e nel modello correlato alle OTU del microbiota intestinale in obesi adolescenti e adulti, e tra questi e gli individui normopeso (Figura 15.). Inoltre il modello proposto associa a *F.prausnitzii* e *Actinomyces*

il profilo del microbiota degli obesi adolescenti, mentre *Parabacteroides*, *B. caccae*, *Rikenellaceae*, *Barnesiellaceae*, e *Oscillospira* al profilo del microbiota degli adolescenti normopeso.

I “markers” identificati in questo studio potrebbero essere considerati per lo sviluppo di nuovi probiotici, età-correlati, che possono portare a definire nuove strategie, basate sulla modulazione del microbiota, per la prevenzione e il trattamento dell’obesità.

**Figura 15.**

### Profili ecologici del microbiota





## ***Bibliografia***

- 1) Nicolucci AC, Reimer RA. (2016). Prebiotics as a modulator of gut microbiota in paediatric obesity. *Pediatr Obes*. e-pub ahead of print, doi: 10.1111/ijpo.12140.
- 2) Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in 510 the United States, 2011-2012. *JAMA* **311**: 806–814.
- 3) Organization for Economic Co-operation and Development. (2014). Obesity and the economics of 518 prevention: fit not fat. Key facts-Italy, update 2014.
- 4) Adair LS, Arora NK, Azizi F, Baur M, Bhutta ZA, Chaloupka FJ, *et al.* (2016). Consideration of the evidence on childhood obesity for the Commission on Ending Childhood Obesity. World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- 5) Kalra G, De Sousa A, Sonavane S, Shah N. (2012). Psychological issues in pediatric obesity. *Ind Psychiatry J* **21**: 11–17.
- 6) Keating CL, Moodie ML, Swinburn BA. (2011). The health-related quality of life of overweight and obese adolescents--a study measuring body mass index and adolescent-reported perceptions. *Int J Pediatr Obes IJPO Off J Int Assoc Study Obes* **6**: 434–441.
- 7) Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG, Fryar CD, Kruszon-Moran D, Kit BK, *et al.* (2016). Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014. *JAMA* **315**: 2292–2299.
- 8) Leslie DB, Kellogg TA, Ikramuddin S. (2009). The surgical approach to management of pediatric obesity: when to refer and what to expect. *Rev Endocr Metab Disord* **10**: 215–229.
- 9) Burguera B, Agusti A, Arner P, Baltasar A, Barbe F, Barcelo A, *et al.* (2007). Critical assessment of the current guidelines for the management and treatment of morbidly obese patients. *J Endocrinol Invest* **30**: 844–852.
- 10) Kong LC<sup>1</sup>, Tap J, Aron-Wisniewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, Zucker JD, Doré J, Clément K. *Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes*. *Am J Clin Nutr*. 2013 Jul;98(1):16-24. doi: 10.3945/ajcn.113
- 11) Cani PD, Delzenne NM. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* **15**: 1546–1558.
- 12) Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, Ross PR, Shanahan F, O'Toole PW, *et al.* (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights. *Gut Microbes* **3**: 186–202.

- 13) Chiu C-M, Huang W-C, Weng S-L, Tseng H-C, Liang C, Wang W-C, *et al.* (2014). Systematic analysis of the association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics approaches. *BioMed Res Int* **2014**: 906168.
- 14) Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, *et al.* (2003). A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* **299**: 2074–2076.
- 15) Nobili V, Vajro P, Dezsöfi A, Fischler B, Hadzic N, Jahnel J, *et al.* (2015). Indications and limitations of bariatric intervention in severely obese children and adolescents with and without nonalcoholic steatohepatitis: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **60**: 550–561.
- 16) Ercolini D, De Filippis F, La Stora A, Iacono M. (2012). ‘Remake’ by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8142–8145.
- 17) Lahr DJG, Katz LA. (2009). Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *BioTechniques* **47**: 857–866.
- 18) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335–336.
- 19) Reeder J, Knight R. (2010). Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nat Methods* **7**: 668–669.
- 20) Edgar RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma Oxf Engl* **26**: 2460–2461.
- 21) Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, Xu Z, *et al.* (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol* **531**: 371–444.
- 22) Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, *et al.* (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* **31**: 814–821.
- 23) Abubucker S, Segata N, Goll J, Schubert AM, Izard J, Cantarel BL, *et al.* (2012). Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput Biol* **8**: e1002358.

- 24) Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, *et al.* (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**: R60.
- 25) Hullar MAJ, Lampe JW. (2012). The gut microbiome and obesity. *Nestlé Nutr Inst Workshop Ser* **73**: 67–79.
- 26) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, *et al.* (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480–484.
- 27) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, *et al.* (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**: 541–546.
- 28) Pihl AF, Fonvig CE, Stjernholm T, Hansen T, Pedersen O, Holm J-C. (2016). The Role of the Gut Microbiota in Childhood Obesity. *Child Obes Print* **12**: 292–299.
- 29) Lin S-W, Freedman ND, Shi J, Gail MH, Vogtmann E, Yu G, *et al.* (2015). Beta-diversity metrics of the upper digestive tract microbiome are associated with body mass index. *Obes Silver Spring Md* **23**: 862–869.
- 30) Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* **69**: 52–60.
- 31) Balamurugan R, George G, Kabeerdoss J, Hepsiba J, Chandragunasekaran AMS, Ramakrishna BS. (2010). Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br J Nutr* **103**: 335–338.
- 32) Moore WEC, Moore LVH. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**: 66– 77.
- 33) Matee MI, Mikx FH, Maselle SY, Van Palenstein Helderma WH. (1993). The influence of dietary sugars and starch on the establishment of *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* in dental plaque of specific pathogen-free rats. *Afr Dent J Off Publ Fed Afr Dent Assoc J Dent Afr FADA* **7**: 1–5.
- 34) Baierlein SA, Wistop A, Looser C, Peters T, Riehle H-M, von Flüe M, *et al.* (2007). Abdominal actinomycosis: a rare complication after laparoscopic gastric bypass. *Obes Surg* **17**: 1123–1126.
- 35) Fernández-Aceñero MJ, Silvestre V, Fernández-Roldán R, Cortés L, García-Blanch G. (2004). Gastric actinomycosis: a rare complication after gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg* **14**: 1012–1015.
- 36) Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, *et al.* (2007). Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* **5**: e156.

- 37) Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri JM, Garagorri M, et al. (2009). Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes* 2005 33: 758–767.
- 38) Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*. e-pub ahead of print, doi: 10.1038/nrmicro2746.
- 39) Begley M, Hill C, Gahan CGM. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72: 1729–1738.
- 40) Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CGM, Marchesi JR. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13580–13585.
- 41) Kitahara M, Sakata S, Sakamoto M, Benno Y. (2004). Comparison among fecal secondary bile acid levels, fecal microbiota and *Clostridium scindens* cell numbers in Japanese. *Microbiol Immunol* 48: 367–375.
- 42) Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte RS, et al. (2014). Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *J Hepatol* 60: 824–831.
- 43) Mayes JS, Watson GH. (2004). Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5: 197–216.
- 44) McCarty MF. (2001). Modulation of adipocyte lipoprotein lipase expression as a strategy for preventing or treating visceral obesity. *Med Hypotheses* 57: 192–200.
- 45) Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J. (2003). Interactions between serum leptin, the insulin-like growth factor-I system, and sex, age, anthropometric and body composition variables in a healthy population randomly selected. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58: 213–219.
- 46) Saengsirisuwan V, Perez FR, Sloniger JA, Maier T, Henriksen EJ. (2004). Interactions of exercise training and alpha-lipoic acid on insulin signaling in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E529-536.
- 47) Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3: 213–223.
- 48) Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341: 1241214.

- 49) Jeraldo P, Sipos M, Chia N, Brulc JM, Dhillon AS, Konkel ME, *et al.* (2012). Quantification of the relative roles of niche and neutral processes in structuring gastrointestinal microbiomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 9692–9698.
- 50) Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, *et al.* (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2365–2370.
- 51) Daniel A. Medina, Juan P. Pedreros, Danae Turiel, Nicolas Quezada *et al.* (2017) Distinct patterns in the gut microbiota after surgical or medical therapy in obese patients. *Peer J* <https://doi.org/10.7717/peerj.3443>
- 52) Kong L-C, Veronique Pelloux Basdevant AJA-W, Bouillot J-L, Tap J-L, Zucker J, Zucker J-D, Karine Clément JD. 2013. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *American Society for Nutrition* **98**:16-24
- 53) Furet J, Kong L, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J, Mariat D, Henegar C, Rizkalla S, Cle K. 2010. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss. *Diabetes* **59**:3049-3057
- 54) Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Stahlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Fandriks L, Le Roux CW, Nielsen J, Backhed F. 2015. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metabolism* **22**:228-238
- 55) Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, Brach T, Liang S, Feng Q, Jørgensen NB+9 more. 2016. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Medicine* **8**(67):1-13



